

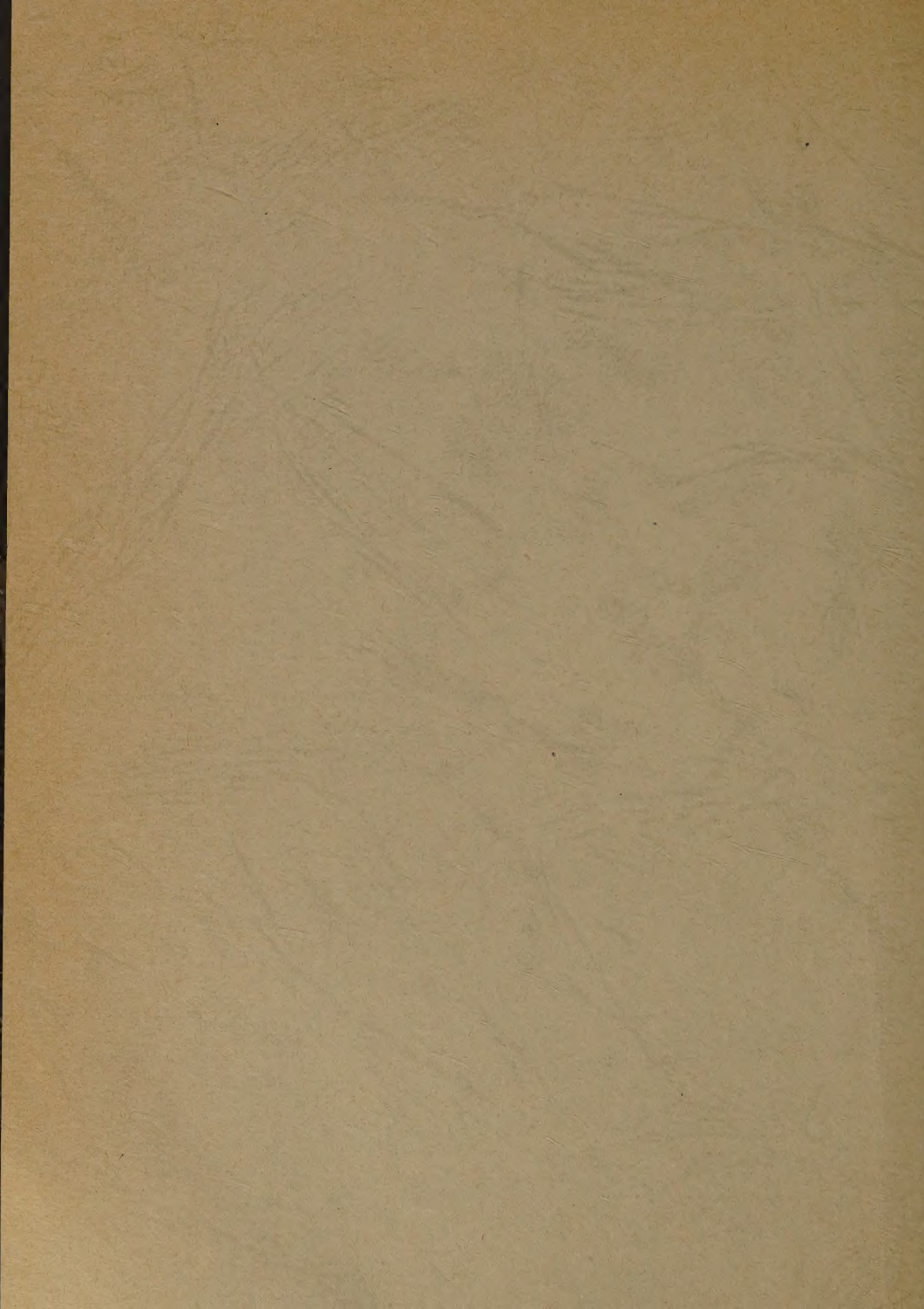
Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Blobel

**Panton-Valentine-Leukozidin bei
Staphylokokken vom Rind**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Heidmarie Soboll
Tierärztin aus Riedelbach/Ts.

Gießen 1971



Aus dem Institut für Bakteriologie und Immunologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen
Direktor: Professor Dr. H. Blobel

**Panton-Valentine-Leukozidin bei
Staphylokokken vom Rind**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von
Heidemarie Soboll
Tierärztin aus Riedelbach/Ts.

Gießen 1971

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät

in Gießen

Dekan: Professor Dr. G. Lämmner

Berichterstatter: Professor Dr. H. Blobel

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Juli 1971



Inhalt

I. Einleitung	1
II. Literaturübersicht	2
A. Entdeckung des PVL	2
B. Andere leukozide Substanzen	3
1) Neisser-Wechsberg-Leukozidin (NWL)	3
2) Leukolysin (LY)	4
C. Wirkung des PVL	4
1) Wirkungsspektrum	4
2) Morphologische Veränderungen	5
3) Biochemische Veränderungen	6
D. Nachweis des PVL	7
1) Mikroskopie	7
2) Bioskopie	8
E. Produktion von PVL	8
F. Reindarstellung von PVL	10
G. Immunologische Bedeutung des PVL	11
III. Material und Methoden	13
A. Staphylokokkenkulturen	13
1) Charakterisierung	13
2) Kultivierung zur PVL-Produktion	14
3) PVL-Nachweis	15
4) Hämolysinbildung	16
5) Charakterisierung der Stämme R 34 und P 83	17

B. PVL-Anreicherung	19
C. PVL-Antikörper	21
1) Herstellung	21
2) Untersuchung	21
IV. Ergebnisse	23
A. Merkmale der Staphylokokkenkulturen	23
B. PVL-Bildung	23
C. Vergleich der Staphylokokkenstämme	
R 34, P 83 und V ₈	29
1) Lysebild	29
2) Wachstum, Toxin- und Enzym-	
produktion	31
3) Anreicherung des PVL	35
4) Serologische Untersuchungen	27
V. Diskussion	44
VI. Zusammenfassung	47
VII. Literaturverzeichnis	48
Anhang	
Lebenslauf	

I. EINLEITUNG

Die lokalen und allgemeinen Krankheitsprozesse, die bei Staphylokokkeninfektionen auftreten, werden meistens von Stoffen verursacht, die von den Staphylokokken produziert werden. Lange Zeit wurde hauptsächlich dem α -Toxin bei der Pathogenese dieser Infektion eine große Rolle zugeschrieben. Inzwischen ist deutlich geworden, daß eine Reihe anderer Produkte für den Verlauf einer Staphylokokkeninfektion ausschlaggebend sind. Eines dieser Produkte ist das Panton-Valentine-Leukozidin (PVL). Das PVL schädigt Leukozyten sowohl in vivo als auch in vitro³⁹.

In der Veterinärmedizin spielen unter den Staphylokokkenenerkrankungen die Mastitiden der Rinder eine bedeutende wirtschaftliche Rolle. Ihre Bekämpfung ist wegen der häufig auftretenden Antibiotika-Resistenz der Staphylokokken nicht immer erfolgreich, so daß die Herstellung eines wirksamen Staphylokokken-Impfstoffes neue therapeutische Wege eröffnen könnte. Zur Entwicklung einer solchen Vaccine ist die Kenntnis der wichtigsten Pathogenitätsfaktoren nötig. Hierzu haben schon mehrere Forscher den Zusammenhang zwischen dem PVL-Bildungsvermögen von Staphylokokken und deren pathogener Wirkung betont^{2,19,24}.

Ebenso wurde auf den Zusammenhang zwischen einem hohen Anti-PVL-Titer und verminderter Anfälligkeit gegenüber Staphylokokkeninfektionen hingewiesen.

Das Ziel dieser Untersuchungen war es, an Staphylokokkenkulturen, die von Rinder-Mastitiden isoliert worden waren, Vorkommen und Häufigkeit des PVL zu bestimmen und dieses Toxin weiter zu charakterisieren.

II. LITERATURÜBERSICHT

A. Entdeckung des PVL

Im Jahr 1894 beschrieb VAN DE VELDE¹⁹ Versuche mit Kaninchen, wobei ein leukozider Effekt von Staphylokokken sichtbar wurde. Nach der intraperitonealen Injektion von lebenden Staphylokokken fand er bei der Untersuchung des Peritonealexsudates Veränderungen an den Leukozyten : 6 bis 10 Stunden nach der Injektion waren alle Leukozyten aus dem Peritonealexsudat tot. Lebende Leukozyten, die er in die Bauchhöhle injizierte, gingen ebenfalls nach kurzer Zeit zugrunde. Daraus schloß er, daß die Staphylokokken einen Stoff produzierten, der toxisch auf die Leukozyten wirkte.

In vitro konnte er den gleichen Effekt erzielen, indem er eine Staphylokokken-Bouillonkultur mit

einer Leukozytensuspension zusammenbrachte. Er lieferte damit den Beweis, daß der leukozide Faktor ein Exotoxin war und nannte es "leucocidine" oder "substance leucocide".

B. Andere leukozide Substanzen

1. Neisser-Wechsberg-Leukozidin (NWL)

Bei den Untersuchungen darüber, ob diese leukozide Substanz Van de Veldes ein selbständiges Toxin oder den damals schon bekannten hämolytischen, dermonekrotischen und letalen Staphylokokkenprodukten zuzuordnen wäre, fanden NEISSER und WECHSBERG 1901²⁹ eine weitere leukozide Substanz. Sie stellten fest, daß ein von ihnen gefundenes Staphylokokken-Toxin sowohl hämolytische als auch leukozide Eigenschaften besaß und hielten es für das Leukozidin Van de Veldes. Erst VALENTINE³⁸ zeigte, daß es verschiedene leukozide Substanzen gab. Bei dem von Neisser und Wechsberg untersuchten Toxin handelte es sich um das α -Hämolysin, das Kaninchenerythrozyten hämolysierte und im Gegensatz zu der "substance leucocide" nur Kaninchengranulozyten, nicht aber Menschengranulozyten zerstörte. WRIGHT⁴⁸ bestätigte diese Befunde und bezeichnete daraufhin den leukoziden Effekt des Hämolysins als "Neisser-Wechsberg-Leukozidin" (NWL) und das Leukozidin Van de Veldes als "Panton-Valentine-Leukozidin" (PVL).

2. Leukolysin (LY)

JACKSON und LITTLE¹⁵ untersuchten 1956 ein weiteres leukozides Staphylokokken-Toxin: das δ -Hämolysin. Es lysierte Granulozyten vom Menschen vollständig und wurde deshalb von GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹⁰ "Leukolysin" (LY) genannt.

Da das PVL das einzige unter den Staphylokokken-leukoziden war, das nur weiße und nicht rote Blutkörperchen zerstörte, wurde es auch als das "wahre Leukozidin" bezeichnet.

C. Wirkung des PVL

1. Wirkungsspektrum

Soweit man bis jetzt weiß, erstreckt sich die leukozide Wirkung des PVL auf Granulozyten und Makrophagen vom Menschen und Kaninchen⁴⁶, außerdem auf Granulozyten von Maus, Schaf und Meerschweinchen⁴¹. SZMIGIELSKI et al.³⁷ wiesen beim Kaninchen einen Abfall der Lymphozyten nach der intravenösen Injektion von PVL nach. KWARECKI et al.²³ injizierten PVL bei Ratten intraperitoneal und fanden im Peritonealexsudat einen Anstieg und teilweise Degeneration von Mastzellen. Die Wirkung von PVL auf verschiedene Gewebekulturzellen wurde von KORBECKI und JELJASZEWICZ²² untersucht. Sie fanden keine Wirkung auf KB-, HEp-, L- und Affennierenzellen. OGURTSOV³¹ jedoch fand einen zytopathogenen Effekt des PVL auf HeLa-Zellen.

Für die bisher beschriebenen Untersuchungen wurde das PVL ausschließlich von Staphylokokkenkulturen gewonnen, die vom Menschen isoliert worden waren. GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹⁰ untersuchten als erste 12 Stämme tierischer Herkunft, von denen 2 PVL und 8 LY bildeten. Von welcher Tierart die Staphylokokken isoliert worden waren, ging aus dem Text leider nicht hervor. Eine größere Anzahl Staphylokokkenstämme vom Rind und vom Hund untersuchte WENK⁴¹. Er konnte sowohl PVL als auch NWL nachweisen. Zur Feststellung der PVL-Wirkung verwendete er Leukozyten vom Menschen, vom Rind und vom Hund. Dabei zeigten die S.aureus-Kulturen vom Hund eine PVL-Reaktion nicht nur mit Menschenleukozyten, sondern auch mit Hundeleukozyten. Die Kulturen vom Rind reagierten zwar mit Menschenleukozyten PVL-typisch, jedoch mit Rinder- und Hundeleukozyten atypisch.

2. Morphologische Veränderungen

VAN DE VELDE³⁹ kennzeichnete die Wirkung von PVL mit den fast klassischen Sätzen: "Dans les premiers moments, on voit les globules blancs pousser des pseudopodes, mais ces manifestations de vie s'arrêtent rapidement : déjà après une minute, le leucocyte a repris la forme ronde et présente aussitôt des alterations : il pâlit considerable-

ment, on dirait que le protoplasme se dissout dans le liquide ambiant, et le noyau, jusqu'alors invisible, devient nettement apparent".

Die morphologischen Veränderungen wurden eingehender von GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹⁰ beschrieben. Danach verloren die Leukozyten vom Menschen, die dem PVL ausgesetzt worden waren, schon in den ersten Minuten ihre Beweglichkeit und die Pseudopodien verschwanden. Auch die Granula bewegten sich nicht mehr aktiv, sondern zeigten nur noch Brown'sche Molekularbewegung. Dann erschienen an der Zellmembran rundliche Protoplasma-Ausstülpungen, die plötzlich ausgestoßen wurden und zum Teil Granula enthielten. So verschwanden die meisten Granula und die übriggebliebenen legten sich eng an die Zellwand an. Die Zelle selbst rundete sich ab und schwoll etwas an. In der Zwischenzeit hatte der Zellkern seine Lappung verloren und sich ebenfalls abgerundet. Er war im Endstadium der morphologischen Veränderungen nur noch undeutlich sichtbar und verschwand schließlich ganz, so daß die Zelle nur noch eine leere Blase darstellte.

3. Biochemische Veränderungen

Die biochemische Wirkungsweise von PVL faßte WOODIN⁴⁷ zusammen.

- a) PVL griff nicht in den Stoffwechsel der Zelle ein. Seine Wirkung richtete sich gegen die Zelloberfläche, wobei jedoch die strukturellen Elemente der Membran intakt blieben.
- b) PVL bewirkte eine spezifische Permeabilitätsänderung der Zellmembran und damit ein Ausströmen von K^+ und Einströmen von Na^+ .
- c) Angriffspunkt des PVL an der Leukozytenmembran war wahrscheinlich das Triphosphoinositid, dessen covalente Struktur verändert wurde.

D. Nachweis des PVL

1. Mikroskopie

Der direkte Nachweis der leukoziden Wirkung des PVL gelang schon VAN DE VELDE³⁹ durch mikroskopische Beobachtung der geschädigten Kaninchenleukozyten. Andere Forscher übernahmen diese Methode^{1,25}. PANTON und VALENTINE³² verwendeten später dazu Menschenleukozyten. Zur Darstellung der charakteristischen morphologischen Veränderungen an den Leukozyten bedienten sich GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹⁰ der Phasenkontrast- und Dunkelfeldmikroskopie. PANTON und VALENTINE³² machten die Zerstörung der Granulozyten im gefärbten Objektträgerausstrich sichtbar. JOHANOWSKY¹⁸ stellte die geschädigten Zellen durch ein differenzierendes Färbeverfahren dar : Gewaschene Blut-

zellen vom Menschen wurden zu verschiedenen Toxinverdünnungen hinzugegeben und 1h bei 37°C bebrütet. Dann wurde zunächst Kongorot und nach weiteren 3 min Nilblau hinzugegeben. Lebende Leukozyten erschienen unter dem Mikroskop hellblau, abgetötete rötlich-braun. Mit dieser Methode ermittelte Johanowsky Werte, die denen der mikroskopischen Betrachtung des Nativpräparates vergleichbar waren.

2. Bioskopie

Eine indirekte Farbindikatormethode zum Nachweis des PVL wurde zuerst von NEISSER und WECHSBERG²⁹ beschrieben und basierte auf dem Sauerstoffverbrauch lebender Leukozyten, wodurch ein Redox-Farbstoff wie Methylenblau zur Leukobase reduziert wurde. JENSEN und MAALØE¹⁷ übernahmen diese Methode, später auch WOODIN⁴², der jedoch Makrophagen als Testzellen verwendete.

E. Produktion von PVL

VAN DE VELDE kultivierte die leukozidinbildenden Staphylokokken in der Bauchhöhle von Kaninchen. Im Exsudat fand er dann PVL und die zerstörten Leukozyten. Durch Kultivierung von Staphylokokken auf zellophanüberschichteten Blutagarplatten gewann JOHANOWSKY¹⁸ hohe Leukozidinkonzentrationen. GLADSTONE und GLENCROSS¹¹ züchteten die PVL-bildenden

Bakterien in vivo in Zellophansäckchen, die Kaninchen, Meerschweinchen, Mäusen und Ratten i.p. eingepflanzt worden waren. Die meisten Autoren gewannen das PVL jedoch aus Bouillonkulturen^{2,10,17,20,29,42}.

Die Zusammensetzung des Kulturmediums spielte für die PVL-Bildung eine nicht unerhebliche Rolle. GLADSTONE und VAN HEYNINGEN¹⁰ modifizierten Casein-Casein-Yeast Medium (CCY-Medium) und erreichten mit diesem "L-Medium" eine verstärkte PVL-Bildung. Wichtig war dabei eine gute Belüftung der Bouillon. WOODIN⁴⁵ fand, daß die zur Herstellung des Mediums verwendeten Hefeextrakte von verschiedenen Firmen verschieden hohe PVL-Werte ergaben. WENK⁴¹ konnte den Einfluß unterschiedlicher Hefeextrakt-Konzentrationen auf die PVL-Bildung nachweisen. Das L-Medium mit der geringsten Konzentration (1%) eines kommerziellen Hefeextraktes, das "LC₃-Medium", lieferte die besten Ergebnisse. Dieses Medium wurde auch von KANOE et al.²¹ verwendet.

Zur PVL-Produktion wurde vielfach der S. aureus-Stamm V₈ verwendet, den VALENTINE³⁸ von einem Patienten mit chronischer Furunkulose isoliert hatte.

F. Reindarstellung von PVL

WOODIN⁴³ gelang es, PVL rein darzustellen. Aus mehreren hundert Litern Kulturüberstand des Stammes V₈ gewann er durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat ein Roh toxin, das er für die weiteren Reinigungsschritte verwendete. Durch fraktionierte Fällungen mit absteigenden Ammoniumsulfat-Konzentrationen, mehrfache Chromatographie auf einer Carboxymethylcellulose-Säule und anschließender Fraktionierung erhielt er zwei PVL-Frak tionen : die schnell ("fast") laufende F-Fraktion und die langsam ("slow") laufende S-Fraktion. Diese beiden Fraktionen reinigte er weiter durch Chromatographie auf Dowex-2 und Amberlite CG-50. Die F- und S-Fraktion ließen sich durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat kristallin darstellen. Beide waren Proteine mit einem Molekulargewicht von 32 000 bei der F-Fraktion und 38 000 bei der S-Fraktion. In 5 M Harnstofflösung dissoziierte die F-Fraktion in zwei Stoffe mit verschiedenen Sedimentationsraten. Die gelöste S-Komponente wurde in einem Luft-Wasser-Gemisch schnell inaktiviert⁴⁵ Beide Fraktionen waren immunologisch distinkt und getrennt nicht leukozid wirksam.

G. Immunologische Bedeutung des PVL

Eine therapeutische Wirksamkeit des Anti-PVL wurde durch mehrere Untersuchungen bestätigt. JOHANOWSKY¹⁹ fand in Versuchsgruppen von Müttern und Neugeborenen, daß Versuchspersonen mit einem hohen Anti-PVL-Titer seltener an Staphylokokkeninfektionen erkrankten als andere, die niedrige Anti-PVL-Titer aufwiesen. Die Titerhöhe des Anti- α -Toxin spielte bei der Resistenz gegen Staphylokokkeninfektionen keine Rolle; d.h. hohe Anti- α -Titer bewahrten nicht vor Erkrankung. BÄNFFER² bestätigte die Ergebnisse Johanowskys. Auch er untersuchte die Abhängigkeit zwischen initialem Anti-PVL-Titer und dem Auftreten von Staphylokokkeninfektionen, insbesondere bei der Mastitis puerperalis des Menschen und fand einen Korrelationskoeffizienten von -1. Eine weitere Bestätigung für die therapeutische Wirksamkeit des Anti-PVL lieferte die umgekehrte Versuchsanordnung. BÄNFFER⁴ immunisierte schwangere Frauen mit einem teilweise gereinigten PVL-Toxoid und konnte, im Gegensatz zu den nicht immunisierten Kontrollpersonen, nur selten das Auftreten von Mastitis puerperalis feststellen.

Bei Tierversuchen wurden ähnliche Ergebnisse ermittelt. VIDAL⁴⁰ immunisierte eine Gruppe Ziegen mit einem PVL-Toxoid, eine andere Gruppe mit α -

und β -Toxoid und ließ eine dritte Gruppe unimpft. Dann infizierte er alle Ziegen mit einem virulenten Staphylokokkenstamm intramammal und beobachtete die Anzahl und Schwere der auftretenden Mastitiden. Die immunisierten Tiere erkrankten weniger oft als die Kontrolltiere, jedoch konnten innerhalb der beiden immunisierten Gruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden; möglicherweise waren die verwendeten Toxine nicht genügend gereinigt worden. STEIN³⁶ stellte ähnliche Untersuchungen an. Er immunisierte eine Gruppe Kaninchen mit PVL-Toxoid, eine zweite Gruppe mit α -Toxoid und eine dritte Gruppe mit beiden Toxinen zugleich. Er fand, daß nur die gegen beide Toxine immunisierten Tiere der Infektion mit einem virulenten, i.v. applizierten Staphylokokkenstamm widerstanden.

III. Material und Methoden

A. Staphylokokkenkulturen

1. Charakterisierung

Als Untersuchungsmaterial dienten 118 Staphylokokkenkulturen, die aus Eutersekretproben von Kühen mit Mastitis isoliert worden waren.

Die Einordnung der Kulturen in die Species S. aureus erfolgte durch Nachweis der Koagulasebildung und Mannitvergärung.

Die Koagulasebildung wurde mit Hilfe des Röhrchentests untersucht. Das hierzu benötigte Plasma wurde aus Natriumzitratblut (0,2 ml einer 3,8%igen Natriumzitratlösung zu 0,8 ml Blut) vom Kaninchen gewonnen und mit 0,14 M NaCl 1:5 verdünnt. Von dieser Plasmalösung wurden 0,5 ml zu der gleichen Menge einer Staphylokokken- LO_3 -Kultur gegeben, die vorher 17 h bei 37°C bebrütet worden war. Die Reaktion konnte nach 3 h Bebrütung (37°C) beurteilt werden. Als positive Koagulasereaktion galt die gallertige Koagulierung des verdünnten Kaninchenplasmas.

Der Nachweis der Mannitvergärung erfolgte mit Hilfe von Platten aus Mannit-Bromthymolblau-Agar⁹. Auf diesen Agarplatten wurden die Staphylokokkenkulturen ausgestrichen und 24 h bei 37°C unter anaeroben Bedingungen bebrütet. Bei der Spaltung

von Mannit trat infolge der Säurebildung eine Gelbfärbung des pH-Indikators auf.

Das Wachstum der Staphylokokkenkulturen auf Kristallviolett-Agar (KV-Agar) gab aufgrund charakteristischer Farbunterschiede Anhaltspunkte zur Einordnung der Kulturen in die Variatio hominis, bovis und canis²⁸. Die Kulturen wurden in Form eines Tüpfels auf den KV-Agar überimpft. Nach 24 h Bebrütung bei 37°C erfolgte die Beurteilung nach dem Schlüssel von MEYER:

Wachstum	Kristallviolett-Gruppe
Orangegelb bis gelb mit violetter Rand	A (Rind)
Violett bis blauviolett	C (Mensch)
Weiß bis bläulich-weiß	E (Hund)

2. Kultivierung zur PVL-Produktion

Die Staphylokokkenkulturen wurden auf Schafblut-agar angezüchtet. Das Agarmedium setzte sich zusammen aus : 0,1% Pepton⁽¹⁾, 0,5% Fleischextrakt nach Liebig, 0,2% Natriumdiphosphat, 0,3% Natriumchlorid und 2% Agar⁽²⁾. Das autoklavierte und auf 56°C abgekühlte Medium wurde nach Zusatz von 10% sterilem Schüttelblut vom Schaf in Platten ausgegossen.

(1) E. Merck AG, Darmstadt

(2) Riedel-de Haen, Seelze, Hannover

Zur Produktion von PVL diente LO_3 -Medium mit dem WENK⁴¹ maximale PVL-Konzentrationen erzielt hatte. Von der bebrüteten Agarkultur (24 h bei 37°C) wurde eine Öse in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben mit 10 ml LO_3 -Bouillon überimpft und 24 h auf der Schüttelmaschine bebrütet (37°C). Die in 100-ml-Erlenmeyerkolben abgefüllte Endkultur bestand aus 2 ml der oben beschriebenen Vorkultur und 20 ml LO_3 -Medium und wurde 17 h auf der Schüttelmaschine kultiviert (37°C). Nach dem Abzentrifugieren der Zellen (11 300 x g, 4°C, 15 min) wurden die Überstände durch Millipore-Filter⁽¹⁾ (0,22 µ) filtriert und entweder gleich untersucht oder bei -18°C aufbewahrt.

3. PVL-Nachweis

Der Nachweis der leukoziden Wirksamkeit der Kulturüberstände erfolgte mit Hilfe der mikroskopischen Methode¹⁰. Diese Methode hatte im Gegensatz zu der indirekten Farbindikatormethode²⁹ den Vorteil, daß durch Beobachtungen der morphologischen Veränderungen an den Leukozyten die PVL-Einwirkung deutlich von der LY-Einwirkung abgegrenzt werden konnte. Für diese Nachweismethode wurden Parafilmobjektträger mit lebenden Leukozyten von Mensch und Rind präpariert⁴¹. Von dem Kulturüberstand wurde mit PBS

(1) Millipore Corporation, Bedford, Mass./USA

(Phosphate-Buffered-Solution)⁸ eine zweifache Verdünnungsreihe hergestellt und 0,02 ml jeder Verdünnungsstufe auf je ein Feld des präparierten Parafilmobjektträgers aufgetropft. Nach 60 min Bebrütung in einer feuchten Kammer bei 37°C konnte das Präparat im Phasenkontrastlicht⁽¹⁾ auf PVL-Einwirkung untersucht werden. Zur Bewertung der PVL-Konzentration wurde die "Minimale Leukozyde Dosis" (MLeD) angegeben, d.h. der Kehrwert der höchsten Verdünnungsstufe, die eben noch an allen Zellen des Präparates charakteristische Veränderungen hervorruft.¹⁰

4. Hämolysinbildung

Da pathogene Staphylokokkenkulturen häufig Hämolyse bilden⁹, wurden die Kulturüberstände auch auf α - und δ -Hämolysin untersucht, die ebenfalls leukozide Wirksamkeit besitzen. Der Nachweis dieser Hämolyse erfolgte nach der Methode von GLADSTONE¹². Als "Minimale Hämolytische Dosis" (MHD) galt der Kehrwert der höchsten Verdünnungsstufe, die eben noch eine vollständige Hämolyse hervorrief.

(1) Neofluar 40/0,75, Carl Zeiss, Oberkochen, Württ.

5. Charakterisierung der Stämme R 34 und P 83

Von den 118 untersuchten Staphylokokkenkulturen wiesen zwei außergewöhnlich hohe PVL-Werte auf: R 34 und P 83. Da beide zugleich niedrige α - und δ -Hämolysin-Konzentrationen besaßen, schienen sie zur PVL-Produktion und -Reinigung geeignet. Deshalb wurde von diesen Kulturen das Lysebild⁽¹⁾, das Wachstum sowie Enzym- und Toxinbildung untersucht und mit dem Stamm V₈ verglichen.

Das Wachstum der Staphylokokkenkulturen wurde photometrisch⁽²⁾ bei 620 nm verfolgt. Die stündlich gemessene Lichtabsorption diente als Maß für das Zellwachstum in den Vor- und Hauptkulturen. Parallel wurde die Produktion von PVL, α - und δ -Hämolysin bestimmt.

Außer leukoziden und hämolytischen Substanzen produzierten die Staphylokokkenkulturen zahlreiche weitere Toxine und Enzyme. Die Kulturen R 34, P 83 und V₈ wurden deshalb zusätzlich auf ihr Toxin- und Enzym-Bildungsvermögen untersucht.

(1) R 34 und P 83 wurden von W. Meyer, Zentral-laboratorium für Lysotomie, Wernigerode und von W. Heeschen, Institut für Milchhygiene, Kiel typisiert. Das Lysebild von V₈ wurde aus den Angaben von Bänffer² übernommen.

(2) Spectronic 20, Bausch & Lomb
L. Hormuth, Heidelberg - Wiesloch

Die Bildung von Phosphatase, sowohl von saurer als auch alkalischer, wurde mit einer von W.SCHAE⁽¹⁾ entwickelten Farbindikatormethode nachgewiesen.

Die folgenden Enzymnachweise wurden quantitativ auf Testagarplatten durchgeführt. Von den einzelnen Stufen einer zweifachen Verdünnungsreihe des Kulturüberstandes wurde je 0,1 ml in Metallzylinder (0,8 x 0,5 cm) getropft, die erhitzt und auf die Testagarplatten aufgesetzt worden waren. Nach 24 h Bebrütung bei 37°C erfolgte die Auswertung der Reaktion.

Die DNase-Aktivität wurde mit einem DNase-Testagar¹⁶ untersucht.

Aus Nutritient Gelatin⁽²⁾ hergestellter Testagar wurde zum Nachweis von Protease verwendet. Tributyrylase wurde auf Tributyrin-Agarmedium⁽³⁾ nachgewiesen.

Der Nachweis des Eigelbfaktors erfolgte mit Hilfe von Eigelb-Plattenmedium³⁰.

Die Fibrinolysin-Aktivität wurde auf Fibrinogen-Plattenmedium¹⁴ nachgewiesen.

Zur Untersuchung von Hyaluronidase wurde Testagar nach SMITH und WILLETT³⁵ verwendet.

-
- (1) Private Mitteilung Dr. Schaege
Institut für Bakteriologie und Immunologie, Gießen
(2) Baltimore Biological Laboratory
Baltimore, Maryland/USA
(3) Oxoid Ltd., London, S.E. 1

Als Endpunkt der Reaktionen wurden diejenigen Verdünnungsstufen gewertet, die eben noch eine Aufhellung des Testagars bewirkten.

B. PVL-Anreicherung

Für weitere Untersuchungen (z.B. Elektrophorese) wurde das PVL der Stämme R 34, P 83 und V₈ durch $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$ -Fällung und durch Gelfiltration angereichert.

Für die Ammoniumsulfat-Fällung wurden von jedem Staphylokokkenstamm 10 - 15 Liter LO_3 -Kultur hergestellt. Dabei richtete sich die Bebrütungsdauer nach dem Zeitpunkt der optimalen PVL-Ausbeute; bei R 34 betrug sie 4 h, bei P 83 18 h und bei V₈ 8 h (s. Abb. 2, 4 und 6). Die Proteine wurden durch Dialyse der zellfreien Kulturüberstände gegen gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung (ASL) ausgefällt, abzentrifugiert und lyophilisiert. Der Proteingehalt des Lyophilisates wurde mit dem Folin-Phenolreagenz nach der Methode von LOWRY et al.²⁶ bestimmt.

Auf der Suche nach einer für die Gelfiltration geeigneten Elutionsflüssigkeit, die eine Aggregation der Proteine verhindert, wurde die Stabilität der Toxinaktivitäten von R 34, P 83 und V₈ in verschiedenen Lösungen geprüft. Je 5 mg Protein/ml

wurden in Harnstoff verschiedener Molaritäten und in ASL verschiedener Konzentration gelöst (s.Tab. 10). Nach 8 Tagen Aufbewahrung sowohl bei 4°C als auch bei Zimmertemperatur wurden die Proben gegen PBS dialysiert und ihre PVL- und Hämolysinaktivitäten geprüft. Infolge dieser Untersuchungen wurde 25%ig gesättigte ASL für die Quellung des Gels, als Elutionsmedium und zur Lösung der Proben verwendet. Auf die mit "Sephadex G 100"⁽¹⁾ gepackte Chromatographiesäule⁽²⁾ wurden etwa 200 mg Protein in 5 ml Lösung mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe⁽³⁾ (Durchflußgeschwindigkeit 9 ml/h) aufgetragen und getrennt. Ein Fraktions-sammler⁽⁴⁾ fing das Eluat in 6 ml-Fractionen auf. Die Extinktion der eluierten Flüssigkeit wurde mit einem Durchflußphotometer⁽⁵⁾ bestimmt und durch einen angeschlossenen Einkanal-Zweifarb-schreiber⁽⁶⁾ aufgezeichnet. Zur Zuordnung bestimmter Proteine zu den einzelnen Peaks des Kurvenverlaufes wurden sämtliche Fractionen auf PVL, α - und δ -Hämolysin, sowie auf die unter A, 5. beschriebenen Enzyme untersucht.

(1) Pharmacia fine Chemicals, Uppsala, Schweden

(2) K 25/45 (2,5 x 45 cm) Pharmacia

(3) "Perplex", LKB-Produkte AB, Stockholm-Bromma, Schweden

(4) "Ultrorac" R

(5) "Uvicord II", LKB

(6) LKB

C. PVL-Antikörper

1. Herstellung

Zur Herstellung von PVL-Antikörpern wurden Kaninchen von 2 - 2¹/₂ kg Gewicht verwendet. Die Immunisierung der Tiere erfolgte durch 10 s.c. Injektionen im Abstand von 3 Tagen. Bei jeder Injektion wurden 5 mg des entsprechenden Rohtoxins in 0,14 M NaCl gelöst und mit der gleichen Menge von inkomplettem Freund'schem Adjuvans⁽¹⁾ emulgiert, verwendet. Eine Woche nach der letzten Injektion konnte das Antiserum durch Herzpunktion gewonnen werden.

2. Untersuchung

Zunächst wurde der Gehalt der gewonnenen Seren an I.E. Anti-PVL mit Hilfe von Standard-Antiserum³⁴ ermittelt. Dies geschah durch Neutralisation der leukoziden Wirkung des PVL von R 34, P 83 und V₈ durch die homologen Antiseren nach der Methode von ROBINSON³³.

Als Testsystem wurden die unter A, 3. beschriebenen Leukozytenpräparationen verwendet; Menschenleukozyten bei der Untersuchung der Antiseren von R 34 und V₈, Rinderleukozyten bei der Untersuchung des P 83 - Antiserums.

(1) Difco-Laboratories, Detroit 1, Michigan

In der Kreuzreaktion wurde die PVL-Wirkung jedes Stammes durch die beiden heterologen Antiseren neutralisiert.

Die elektrophoretische Trennung der Antigene erfolgte 4 h bei 4°C in Veronal-Puffer T = 0,1 , pH 8,6 bei 6 mA/Elektrophoreseschiene. Anschließend wurden die seitlich angefertigten Rinnen mit Antiserum beschickt und zwar bei jedem Stamm in drei Versuchsanordnungen sowohl mit dem homologen Antiserum als auch mit standartisiertem Anti- α -Toxin⁽¹⁾ und standartisiertem Anti-PVL⁽²⁾. Nach 24 h bei etwa 20°C konnten die Präzipitatbögen abgelesen werden. Zugleich wurden aus 1 cm breiten Abschnitten der Parallelelektrophorogramme die aufgetrennten Antigene 24 h bei 4°C in PBS extrahiert. Die Untersuchung dieser Extrakte auf PVL, α - und δ -Hämolysin, Protease, Phosphatase und DNase nach der unter A, 5. beschriebenen Methode diente als Kontrolle und erlaubte weiterhin eine annähernde Zuordnung von Protease, Phosphatase und DNase zu den gefundenen Präzipitationslinien.

(1) Wellcome Research Laboratories
Beckenham, England

(2) Staatens Serum-Institut, Kopenhagen, Dänemark

IV. ERGEBNISSE

A. Merkmale der Staphylokokkenkulturen

Anhand der Koagulasebildung und Mannitvergärung wurden 90 % der 118 untersuchten Staphylokokkenkulturen S. aureus, die restlichen 10 % S. epidermidis zugeordnet⁶. Mit Hilfe der Kristallviolett-Reaktion konnten 68 % der Kulturen in die "Variatio bovis" und 32 % in die "Variatio hominis" eingeordnet werden.²⁸

B. PVL-Bildung

Die Untersuchung der Staphylokokkenkulturen auf ihr PVL-Bildungsvermögen wurde nicht nur mit Hilfe von Menschenleukozyten sondern auch mit Rinderleukozyten durchgeführt. Hiermit sollte festgestellt werden, ob Staphylokokken auf Leukozyten der Spezies, von der sie isoliert worden waren, eine stärkere leukozide Wirksamkeit ausübten als auf Leukozyten vom Menschen.

Unter 118 vom Rind isolierten Kulturen konnten 93 gefunden werden, die PVL bildeten. Von diesen PVL-Bildern gehörten nicht alle zur Spezies S. aureus (Tab. 1).

Tabelle 1:

PVL-Bildung und Spezies der Staphylokokkenkulturen

Kulturen	Anzahl	Spezies	
		<u>S.aureus</u>	<u>S.epid.</u>
Gesamtzahl	118	107	11
PVL-pos.	93	82	11

Die PVL-Wirksamkeit erstreckte sich bei der Mehrzahl der Kulturen sowohl auf Menschen- als auch auf Rinderleukozyten. Nur jeweils 7,6 % der Kulturüberstände waren nur auf eine Leukozytenart wirksam (Tab. 2).

Tabelle 2:

PVL-Wirksamkeit der Staphylokokkenkulturen

Kulturen	Anzahl	Prozent
Gesamtzahl	118	100,0
PVL-positiv	93	78,8
PVL-pos. mit ML + RL*	75	63,6
PVL-pos. nur mit ML	9	7,6
PVL-pos. nur mit RL	9	7,6

* ML = Menschenleukozyten
RL = Rinderleukozyten

Die mit Menschen- und Rinderleukozyten festgestellten MLeD-Werte waren unterschiedlich hoch (Tab.3). Auffallend war, daß sehr hohe MLeD-Werte (> 512) nur mit Rinderleukozyten zu ermitteln waren. Die insgesamt 4 Kulturüberstände mit MLeD-Werten > 512 zeigten geringe Wirkung auf Menschenleukozyten. Umgekehrt übten die Kulturen mit starker PVL-Wirkung auf Menschenleukozyten nur geringe Wirkung auf Rinderleukozyten aus (Tab.4).

Tabelle 3:

Vergleich der MLeD-Werte bei Einwirkung der Kulturüberstände PVL-positiver Kulturen auf Menschen- und Rinderleukozyten

Anzahl der Kulturen		
MLeD	PVL-Wirkung auf Menschenleukozyten (Gesamtzahl 84)	PVL-Wirkung auf Rinderleukozyten (Gesamtzahl 84)
1-8	65 (77,3 %)	65 (77,3 %)
16-64	17 (20,3 %)	8 (9,6 %)
128-512	2 (2,4 %)	7 (8,3 %)
> 512	- -	4 (4,8 %)

Tabelle 4:

Vergleich der Kulturüberstände mit den höchsten MLeD-Werten mit Menschen- und Rinderleukozyten

Kulturen	Leukozyten	
	Mensch MLeD	Rind MLeD
R 29	4	1024
R 66	4	1024
R 145	8	1024
P 83	4	8192
R 34	512	8
R 82	128	-

Die naheliegende Vermutung eines Zusammenhanges zwischen der Zugehörigkeit der PVL-bildenden Kulturen zur "Variatio hominis bzw. bovis" und ihrer leukoziden Wirksamkeit auf Rinder- oder Menschenleukozyten konnte nicht bestätigt werden. Vielmehr zeigten die Staphylokokkenkulturen beider Unterarten auffallend gleichmäßig verteilte Wirkung auf beide Leukozytenarten.(Tab.5). Auch für die auf beide Leukozytenarten unterschiedlich stark wirksamen Kulturen konnte keine Korrelation gefunden werden zwischen der Unterart und der dominierenden PVL-Wirkung auf eine Leukozytenart.

Tabelle 5:

PVL-Wirkung und Zugehörigkeit zu Unterarten

Wirkung der PVL-bildenden Kulturen auf	Var. bovis 100 % $\cong$ 60 Kult.	Var. hominis 100 % $\cong$ 33 Kult.
Rinderleukoz. + Menschenleukoz.	80 %	82 %
Menschenleukoz.	10 %	9 %
Rinderleukoz.	10 %	9 %

Im Hinblick auf die Auswahl geeigneter Kulturen zur Anreicherung von PVL wurde weiterhin von allen Kulturen die α - und ϕ -hämolytische Wirkung bestimmt, da beide Hämolsine ebenfalls leukozide Effekte aufweisen. Das Ziel war es, Staphylokokkenkulturen zu finden, die hohe MLeD-Werte bei zugleich niedrigen MHD-Werten besaßen. Aus Tabelle 6 ist ersichtlich, daß alle stark PVL-produzierenden Kulturen (MLeD > 64) zugleich α -Hämolysin bildeten. Lediglich bei den Kulturen mit niedriger MLeD war nicht bei allen Kulturüberständen α -Hämolysin nachzuweisen. Zwischen der Höhe der MLeD und der Höhe der MHD bestand bei den einzelnen Kulturen keine Korrelation, d.h. hohe MLeD-Werte gingen nicht immer

mit hohen MHD-Werten einher. Eine Beziehung zwischen PVL-Bildung und der Produktion von δ -Hämolysin war nicht zu erkennen.

Tabelle 6:

Zusammenhang zwischen MLeD-Werten und α - und δ -Hämolysinbildung

MLeD	Anzahl der Kulturen mit PVL-Wirkung auf	α -Hämolysin- positive Kulturen (in%)	δ -Hämolysin positive Kulturen (in%)
	Menschenleukozyten		
1-8	65	98,5 %	63,0 %
16-64	17	100,0 %	64,7 %
128-512	2	100,0 %	50,0 %
512	-	-	-
	Rinderleukozyten		
1-8	65	93,8 %	61,5 %
16-64	8	87,5 %	62,5 %
128-512	7	100,0 %	85,8 %
512	4	100,0 %	75,0 %

C. Vergleich der Staphylokokkenstämme R 34, P 83
und V₈

Alle bisher im Hinblick auf die Reindarstellung von PVL durchgeführten Untersuchungen wurden mit Hilfe des Staphylokokkenstammes V₈ vorgenommen, der vom Menschen isoliert worden war.

In den Voruntersuchungen dieser Arbeit erschienen zwei vom Rind isolierte Staphylokokkenkulturen zu weiteren Versuchen besonders geeignet: R 34 zeigte, ähnlich wie V₈, starke PVL-Wirksamkeit auf Menschenleukozyten (MLeD = 512), P 83 war besonders stark auf Rinderleukozyten wirksam (MLeD = 8192) (Tab.4). Beide Stämme wiesen zugleich relativ niedrige MHD-Werte auf. Ziel der weiteren Untersuchungen war es, das PVL dieser beiden Kulturen mit dem von V₈ zu vergleichen.

1. Lysebild

Zunächst wurden diese Kulturen mit Hilfe des Internationalen Phagensatzes typisiert.⁵ R 34 reagierte mit Phagen der Gruppe II; P 83 mit Phagen der Gruppen I und M, weiterhin mit Phagen der Gruppe I des Davidson-Phagensatzes, also mit "bovinen" Phagen.⁷ V₈ zeigte Lyse durch Phagen der Gruppen I, II, III und IV des Internationalen Phagensatzes (Tab.7).

Hierdurch konnte die durch die Kristallviolett-Reaktion ermittelte Zugehörigkeit der Stämme R 34 und V₈ zur "Variatio hominis" bestätigt werden; eine Klassifizierung von P 83 war aufgrund dieses Lysebildes nicht möglich.

Tabelle 7:

Lysebild der Staphylokokkenstämme R 34, P 83 und V₈

Stämme	Lyse durch Phagen des Int. Phagensatzes	Phagengruppe
R 34	3C, 55, 71	II
P 83	29, 52, 52A, 80	I
	81	M
	----- 29, 52A, AC ₁	I*
V ₈	52, 52A, 79, 80	I
	54	II
	42E, 53	III
	42D	IV

* Phagen des Davidson-Phagensatzes

2. Wachstum, Toxin und Enzymproduktion

Voraussetzung für die Produktion und nachfolgende Anreicherung von PVL waren Kenntnisse über das Verhalten dieser Stämme beim Wachstum in der Bouillonkultur (LO_3).

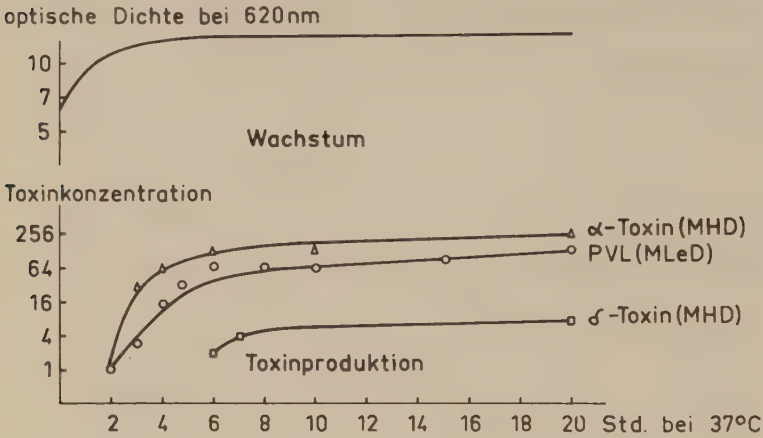
Im Gegensatz zu V_8 setzte die Toxinbildung bei R 34 und P 83 bereits während der logarithmischen Phase des Zellwachstums ein. (Abb. 1, 3, 5).

Beim Vergleich des Zellwachstums und der Produktion von PVL, α - und δ -Hämolysin in den Vorkulturen zeigten sich deutliche Unterschiede. Im Gegensatz zu V_8 setzte die Toxinbildung bei R 34 und P 83 bereits während der logarithmischen Phase des Zellwachstums ein (Abb. 1, 3, 5). Die Wachstums- und Produktionskurven der Hauptkulturen ergaben Anhaltspunkte für die optimale Bebrütungsdauer zur PVL-Produktion (Abb. 2, 4, 6). Für jeden der 3 Stämme konnte eine bestimmte Zeit angegeben werden, zu der die PVL-Produktion schon relativ hoch, die Hämolysinkonzentration dagegen noch relativ niedrig war. Die günstigsten Bebrütungszeiten lagen für die Stämme R 34, V_8 , P 83 bei 4, 8 und 18 Stunden.

Im Hinblick auf die Anreicherung und spätere Reinigung von PVL war es notwendig, die außer PVL, α - und δ -Hämolysin in den zellfreien Kulturüber-

Abb. 1

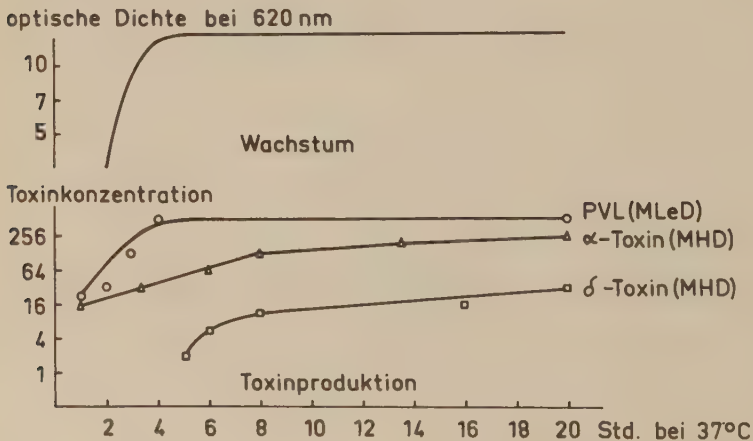
Wachstum und Toxinproduktion des Staphylokokkenstammes R 34 in der "Vorkultur"*



* Etwa 5 Bakterienkolonien suspendiert in 10 ml LO_3 -Medium

Abb. 2

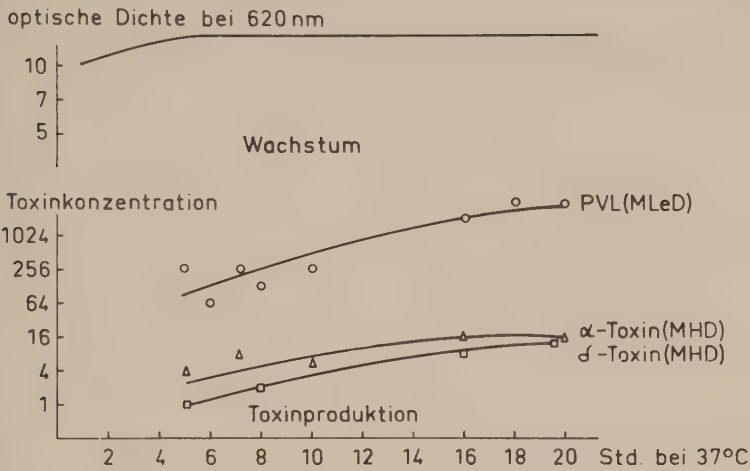
Wachstum und Toxinproduktion des Staphylokokkenstammes R 34 in der "Hauptkultur"*



* 20 ml der 4 Std. bei 37°C bebrüteten "Vorkultur" zu 180 ml LO_3 -Medium

Abb. 3

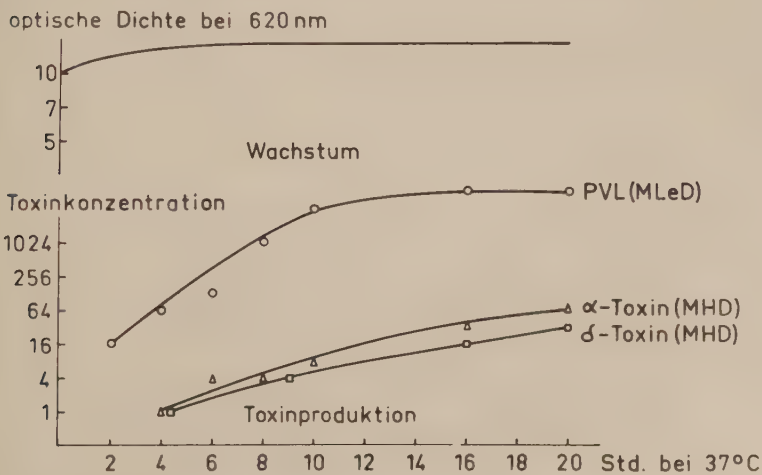
Wachstum und Toxinproduktion des Staphylokokkenstammes P83
in der "Vorkultur" *



* Etwa 5 Bakterienkolonien suspendiert in 10 ml LO_3 -Medium

Abb. 4

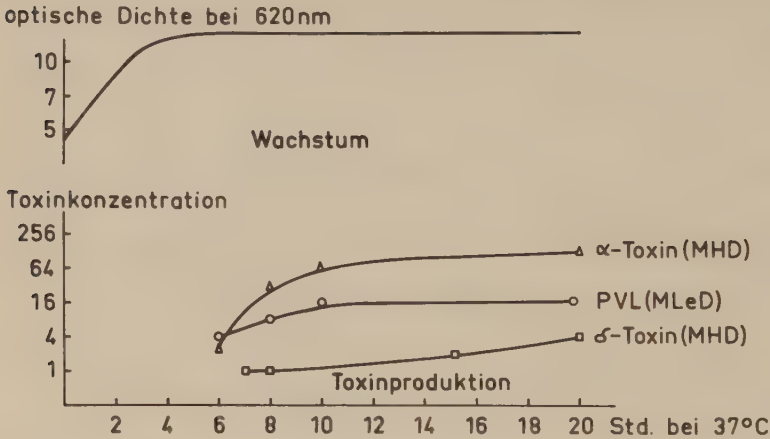
Wachstum und Toxinproduktion des Staphylokokkenstammes P83
in der "Hauptkultur" *



* 20 ml der 4 Std. bei 37°C bebrüteten "Vorkultur" zu 180 ml LO_3 -Medium

Abb. 5

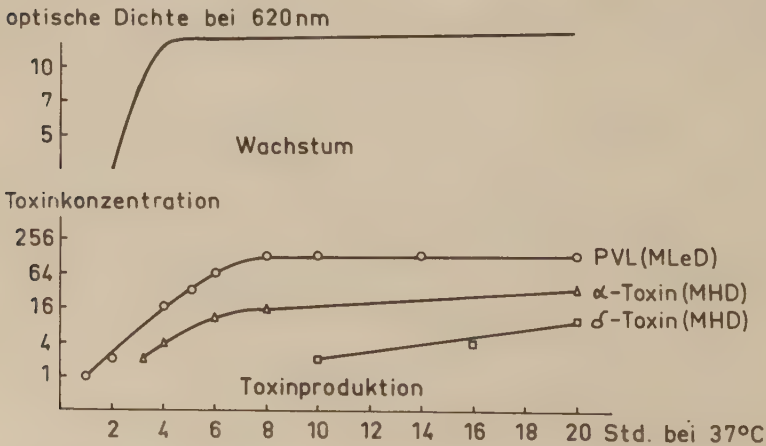
Wachstum und Toxinproduktion des Staphylokokkenstammes V₈ in der "Vorkultur"*



* Etwa 5 Bakterienkolonien suspendiert in 10 ml LO₃-Medium

Abb. 6

Wachstum und Toxinproduktion des Staphylokokkenstammes V₈ in der "Hauptkultur"*



* 20ml der 4 Std. bei 37°C bebrüteten "Vorkultur" zu 180ml LO₃-Medium

ständen vorhandene Substanzen festzustellen. Eine vergleichende Übersicht über das Enzym- und Toxinspektrum von R 34, P 83 und V₈ wurde in Tabelle 8 dargestellt.

3. Anreicherung des PVL

Die von Woodin beschriebene Methode der Reindarstellung von PVL war ein kompliziertes Verfahren, das darüberhinaus große Mengen an Ausgangsmaterial erforderlich machte. Deshalb wurde in dieser Arbeit das relativ einfache Verfahren der Gelfiltration angewendet.

Um Aggregationen der Proteine zu verhindern oder zumindest zu verringern, wurde die Brauchbarkeit von Harnstoff verschiedener Molaritäten und von Ammoniumsulfat in unterschiedlichen Konzentrationen als Elutionsflüssigkeit für die Gelfiltration geprüft. Die Proteine der drei Kulturüberstände waren in Ammoniumsulfat-Lösungen von 10 - 30 % Sättigung gut löslich. Die PVL-Aktivität blieb sowohl bei 4°C als auch bei Zimmertemperatur in diesen Lösungen über 8 Tage voll erhalten. In den verwendeten Harnstofflösungen waren die Proteine aller drei Stämme zwar löslich, jedoch nicht stabil (Tab.9). Für die Gelfiltration wurde deshalb 25 % saturierte Ammoniumsulfat-Lösung verwendet.

Tabelle 8:

Enzyme und Toxine von R 34, P 83 und V₈

Enzyme und Toxine	R 34	P 83	V ₈
1. PVL			
MLeD mit Menschen- leukozyten	512	4	128
MLeD mit Rinder- leukozyten	8	8192	4
2. α -Hämolysin (MHD)	64	32	32
3. σ -Hämolysin (MHD)	16	8	4
4. Koagulase	±	-	+
5. Phosphatase saure alkalische	+ -	+ +	+ -
6. DNase ⁽¹⁾	512	512	512
7. Protease ⁽¹⁾	-	16	64
8. Lipase ⁽¹⁾	4	2	2
9. Eigelbfaktor ⁽¹⁾	64	-	-
10. Fibrinolysin ⁽¹⁾	-	-	4
11. Hyaluronidase ⁽¹⁾	-	2	-

(1) Kehrwert der letzten Verdünnungsstufe, die eben noch eine Aufhellung des Indikator-Agars bewirkt.

Die beste Auftrennung der Proteine an Sephadex G 100 wurde mit dem Stamm P 83 erreicht (Abb.8). Aber auch mit den Proteinen der beiden anderen Stämme wurden deutlich voneinander abgesetzte Peaks erzielt (Abb. 7 und 9), deren zugehörige Enzym- und Toxinaktivitäten sich jedoch stärker überschnitten als bei P 83.

Bei allen Stämmen waren PVL, α -Hämolysin und DNase nicht voneinander zu trennen. Das Maximum ihrer Aktivitäten lag immer im gleichen Peak und zwar in den Fraktionen 21 - 23. Dieser Peak setzte sich deutlich ab von den davorliegenden Peaks mit den Maxima der Aktivitäten von Tributyrinase, Eigelbfaktor, Phosphatase und δ -Hämolysin. Dem letzten und höchsten Peak waren keine Enzym- und Toxinaktivitäten zuzuordnen, jedoch fand sich in seinen Fraktionen das Pigment der aufgetragenen Proben wieder.

4. Serologische Untersuchungen

Mit Hilfe serologischer Untersuchungen wurde versucht festzustellen, ob Unterschiede bestehen zwischen den von den einzelnen Stämmen isolierten PV-Leukozidinen.

Die Neutralisationsreaktion bestätigte die neutralisierende Wirksamkeit der einzelnen Antiseren gegenüber dem PVL der zugehörigen Staphylokokken-

Tabelle 9:

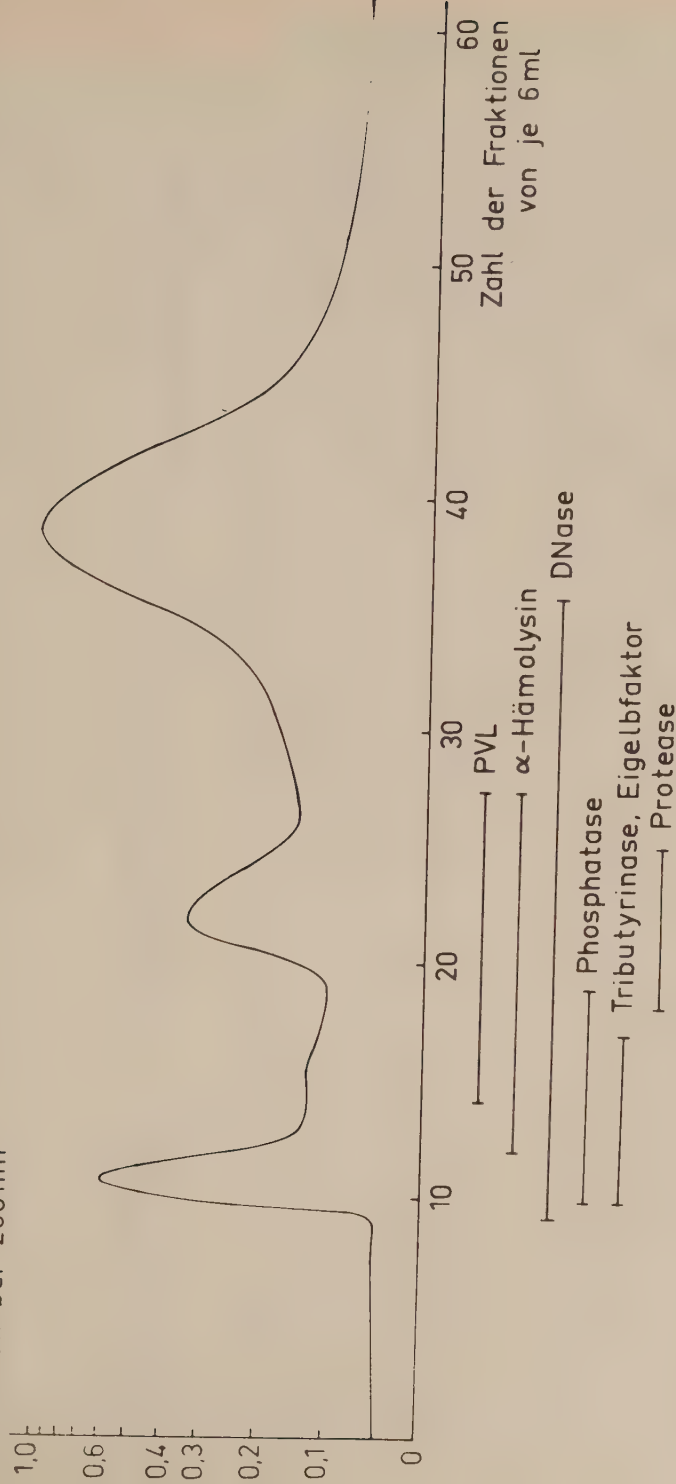
Stabilität der PVL- und α -Hämolysinaktivität in verschiedenen Elutionsflüssigkeiten für die Gelfiltration, nach 8 Tagen Aufbewahrung

Elutions- flüssigkeit	Toxin-Aktivitäten					
	R 34		P 83		V ₈	
	PVL (MLeD)	α -Toxin (MHD)	PVL (MLeD)	α -Toxin (MHD)	PVL (MLeD)	α -Toxin (MHD)
4 M Harnstoff	32	16	512	16	16	—
5 M Harnstoff	128	64	1024	64	4	—
6 M Harnstoff	128	128	512	64	8	—
8 M Harnstoff	128	64	512	32	4	—
10 % ASL	512	256	2048	128	1024	256
20 % ASL	1024	128	4096	64	2048	64
25 % ASL	2048	128	8192	128	1024	32
30 % ASL	2048	128	8192	256	2048	128
40 % ASL	256	128	1024	128	64	8
50 % ASL	512	128	2048	128	128	32
60 % ASL	512	64	2048	64	256	8
PBS	512	64	1024	64	256	16
PBS*	2048	256	16384	512	2048	256

* Aktivitätsmessung sofort nach Auflösung der Probe

Abb 7

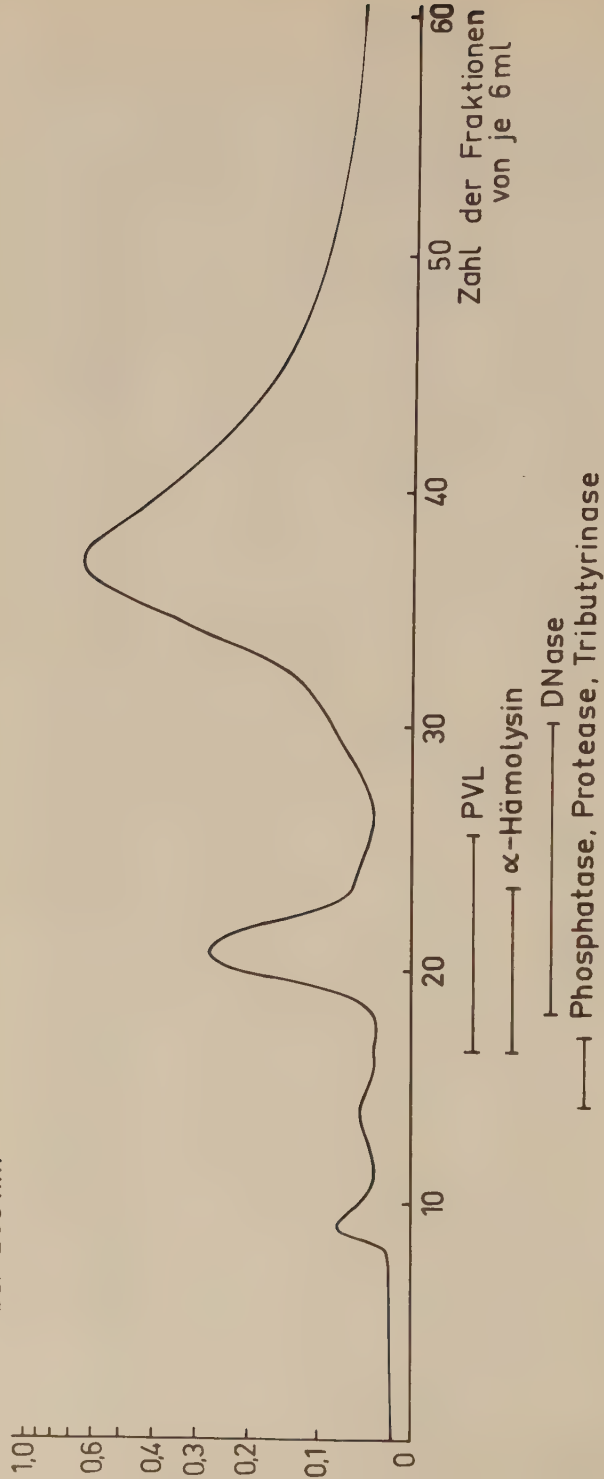
Extinktion bei 280nm



Fraktionierung des mit Ammoniumsulfat-Lösung gefällten Kulturüberstandes vom Staphylokokkenstamm R34 mit Sephadex G-100

Abb. 8

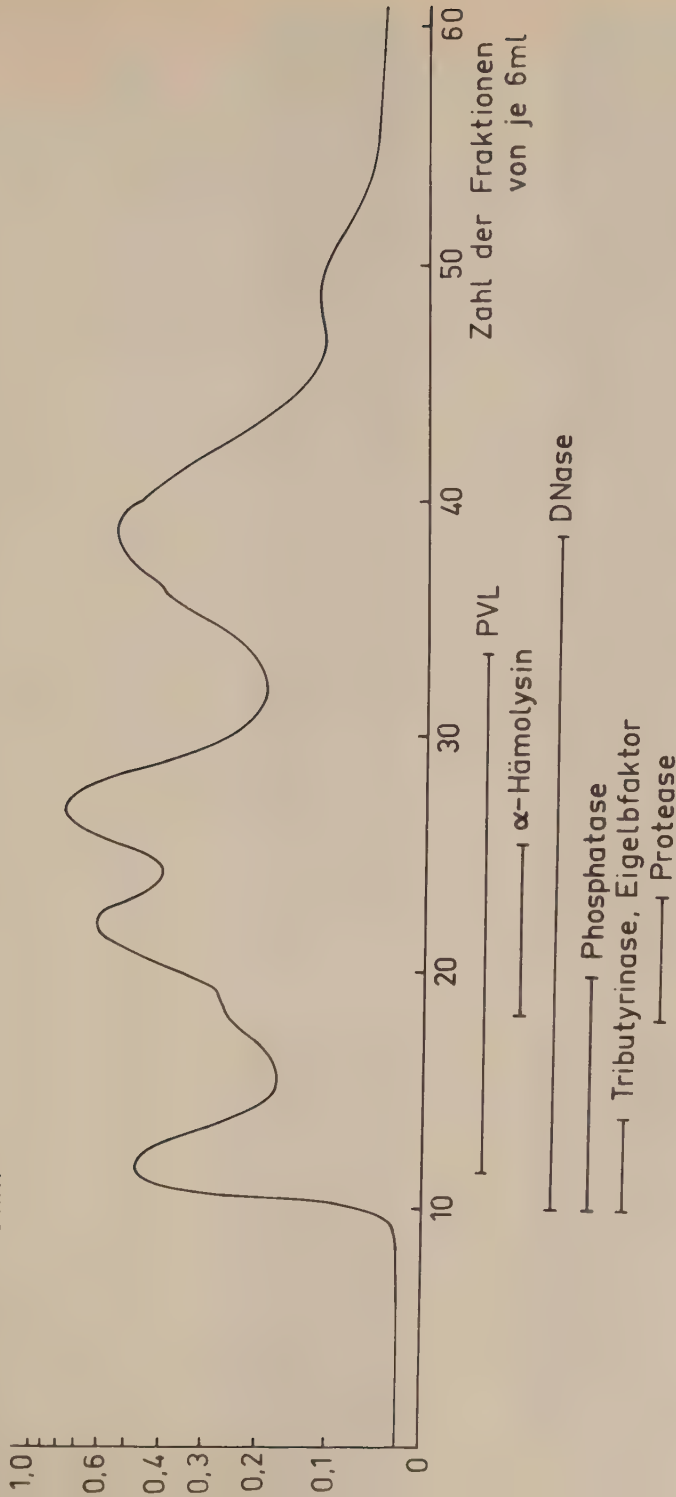
Extinktion bei 280 nm



Fraktionierung des mit Ammoniumsulfat-Lösung gefällten Kulturüberstandes vom Staphylokokkenstamm P83 mit Sephadex G-100

Abb. 9

Extinktion bei 280 nm



Fraktionierung des mit Ammoniumsulfat-Lösung gefällten Kulturüberstandes vom *Staphylokokkenstamm* Vg mit Sephadex G-100

stämme. Zugleich war es möglich durch Neutralisationsreaktionen mit standartisiertem Antiserum den Gehalt der Immunseren an Anti-PVL in I.E. zu ermitteln. In 1 ml der Antiseren waren bei R 34, P 83 und V_8 jeweils 8, 64 und 10 I.E. Anti-PVL enthalten.

Eine Neutralisation der PVL-Wirkung war bei allen drei Stämmen nicht nur mit den homologen, sondern auch mit den heterologen Antiseren zu erreichen (Kreuzreaktionen). Dies bedeutete, daß die PVL-Präparationen der drei Stämme serologisch nicht zu unterscheiden waren. Weiterhin wurden mit dem durch Gelfiltration angereichertem Material immunelektrophoretische Untersuchungen durchgeführt. Im Immunelektrophorogramm erschienen bei R 34 und V_8 mehrere Präzipitationslinien, bei P 83 jedoch nur eine einzige. Die außerdem mit Hilfe von Anti-PVL und Anti- α -Toxin hergestellten zusätzlichen Immunelektrophorogramme halfen die PVL- und α -Hämolysin-Linien zu identifizieren (Abb.10). Auffallend war, daß beide PVL-Linien nur bei R 34 und V_8 erschienen, während bei dem Stamm P 83 nur eine Linie sichtbar wurde.

Abbildung 10

Immunelektrophorogramm* der durch Gelfiltration vorgereinigten PVL-Präparate der Staphylokokkenstämme

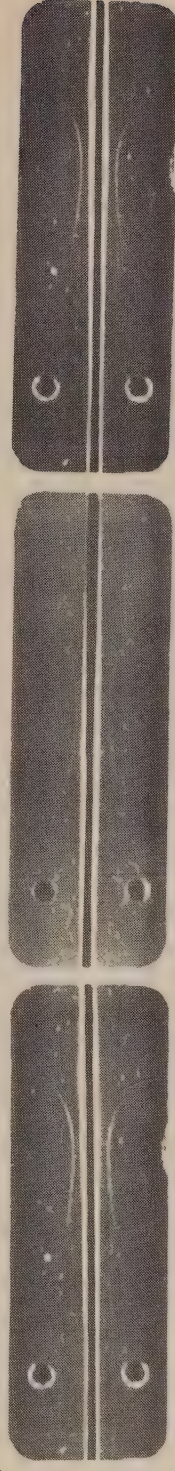
R 34

P 83

V 8



Rinne mit homologem Antiserum beschickt



Rinne mit Standard-Anti-PVL beschickt

* Elektrophoretische Trennung 4 Std. bei 4°C und 6 mA/Elektrophoreseschiene in Veronalpuffer (pH 8,6)

V. DISKUSSION

Über die Bedeutung des PVL bei Staphylokokkenkrankungen des Rindes war bisher wenig bekannt. So konnte WENK bei von Rindern isolierten Staphylokokkenkulturen nur wenig (22 %) PVL-Bildner ermitteln, die jedoch keine typische Schädigung bei Rinderleukozyten hervorriefen. Im Gegensatz dazu war es bei den Untersuchungen dieser Arbeit möglich, unter den vom Rind isolierten Staphylokokkenkulturen eine bedeutend größere Anzahl (79 %) von PVL-Bildnern zu finden.

Die naheliegende Vermutung, daß auf Rinderleukozyten wirksame Kulturen zur "Variatio bovis" gehörten, bestätigte sich nicht. Vielmehr wirkten die Staphylokokkenkulturen der "Variatio bovis" wie auch der "Variatio hominis" zu gleichen Teilen auf beide Leukozytenarten. Somit mußte angenommen werden, daß der unterschiedlichen Wirkungsweise ein komplizierter Mechanismus zugrunde liegt. Damit ist jedoch ein Hinweis darauf gegeben, daß PVL auch bei Staphylokokkeninfektionen des Rindes, insbesondere bei der Mastitis, als Pathogenitätsfaktor eine Rolle spielen könnte. Bei der vielfach diskutierten Möglichkeit, das Mastitisproblem bei Rindern mit Hilfe einer Staphylokokken-Vaccine zu lösen, sollte das PVL berücksichtigt werden.

Von der Überlegung ausgehend, daß es möglicherweise ein spezifisch auf Rinderleukozyten wirksames Leukozidin geben könnte, das sich von PVL unterschied, wurden zwei Staphylokokkenstämme boviner Herkunft eingehender auf ihr serologisches Verhalten untersucht. Besonderes Interesse galt dem Stamm P 83, der besonders stark auf Rinderleukozyten wirksam war.

Gegen das Vorhandensein eines "Rinderleukozidins" sprach die Tatsache, daß ein spezifisch neutralisierendes Verhalten des Anti-PVL der drei verglichenen Stämme nicht nachzuweisen war. Selbst das PVL des Stammes P 83 zeigte nach Neutralisation mit Antiserum des "Menschenleukozidins" der Stämme V₈ und R 34 keinerlei Wirkung mehr auf Rinderleukozyten. Da unter Umständen auch eine unspezifische Neutralisation möglich war, wurde die Immunelektrophorese zur weiteren Klärung herangezogen. Hierbei waren deutliche Unterschiede zwischen dem PVL des Stammes P 83 und dem der beiden anderen zu erkennen: Während bei R 34 und V₈ beide PVL-Präzipitationslinien sichtbar wurden, erschien bei P 83 nur eine PVL-Linie. Dies könnte bedeuten, daß entweder dieses "Rinder-PVL" nur aus einer der beiden Fraktionen des "Menschen-PVL" bestand oder daß sich die zweite Fraktion serologisch unterschiedlich verhielt. Um allerdings eine endgültige

Aussage zu treffen, müßten Untersuchungen mit hochgereinigtem Material vorgenommen werden.

Deshalb wurden zur Vorbereitung weiterer Untersuchungen erste Reinigungsschritte mit Hilfe der Gelfiltration vorgenommen. Hiermit war jedoch nur eine Teilreinigung zu erzielen, da α -Hämolysin und DNase von PVL nicht abzutrennen waren. Diese Ergebnisse stimmten mit denen von HALLANDER¹³ überein, der versucht hatte, Rohtoxin aus Staphylokokkenkulturen ebenfalls durch Gelfiltration aufzutrennen.

Zur endgültigen Reindarstellung des PVL könnte zunächst die Trennschärfe der Gelfiltration durch Verwendung eines feinkörnigen Gels sowie einer längeren und dünneren Säule erhöht werden. Mit diesem Verfahren wäre jedoch noch keine endgültige Abtrennung des α -Hämolysins und der DNase vom PVL zu erwarten. Deshalb wäre als weiterer Reinigungsschritt die Absorption dieser beiden Stoffe durch Aluminiumoxyd-Cholesterin²¹ zu versuchen. Zurückbleibende geringere Verunreinigungen müßten dann mit Hilfe elektrophoretischer Trennmethode entfernt werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Von 118 Staphylokokkenkulturen vom Rind bildeten 93 (79 %) Panton-Valentine-Leukozidin (PVL). Das PVL war nicht nur auf Menschenleukozyten (ML), sondern häufig auch auf Rinderleukozyten (RL) wirksam. Von den 93 PVL-positiven Kulturen waren wirksam auf ML und RL 75 (80 %), auf RL allein 9 (10 %) und auf ML allein ebenfalls 9 (10 %). Ein Zusammenhang zwischen der PVL-Wirkung auf Rinder- oder Menschenleukozyten und der Zugehörigkeit der Kultur zur "Variatio bovis bzw. hominis" konnte nicht festgestellt werden.

Eingehendere serologische Untersuchungen wurden an dem PVL zweier Stämme durchgeführt, von denen der eine (R 34) besonders stark auf ML, der andere (P 83) auf RL wirksam war. Im "Neutralisationstest" konnten die beiden PVL-Präparate nicht unterschieden werden. Im Immunelektrophorogramm wurde bei P 83, im Gegensatz zu R 34, nur eine Präzipitationslinie sichtbar.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. BAIL, O.: Über leukozide Substanzen in den Stoffwechselprodukten des Staphylococcus pyogenes aureus
Arch. Hyg. 32, 133-171 (1898)
2. BÄNFFER, J.R.J.: Antileucocidine by staphylokokken-infecties
Proefschrift Utrecht (1962)
3. BÄNFFER, J.R.J.: Anti-leucocidin and mastitis puerperalis
Brit. med. J. 62, 1224-1226 (1962)
4. BÄNFFER, J.R.J.: Immunization with leucocidin toxoid
FRANKEN, J.F. against staphylococcal infection
Path. et. Microbiol. 30, 166-174 (1967)
5. BLAIR, J.E.: Phage typing of staphylococci
WILLIAMS, R.E.O. Bull. Wed. Heth. Org. 24, 771 (1961)
6. BREED, R.S.: Bergey's Manual of Determinative
MURRAY, E.G.D. Bacteriology
SMITH, N.R. The Williams & Wilkins Company,
Baltimore (1957)
7. DAVIDSON, J.: A set of bacteriophages for typing
bovine staphylococci
Res. Vet. Sci. 2, 396 (1961)
8. DULBECCO, R.: Plaque formation and isolation of
VOGT, M. pure lines with poliomyelitis viruses
J. exp. Med. 99, 183 (1954)
9. ELEK, S.D.: Distribution of haemolysin in
pathogenic staphylococci
J. Path. Bact. 62, 541-554 (1950)
10. GLADSTONE, G.P.
VAN HEYNINGEN, N.E.: Staphylococcal leucocidins
Brit. J. exp. Path. 38, 123-137 (1957)

11. GLADSTONE, G.P.: Growth and toxin production of staphylococci in cellophan sacs in vivo
GLENCROSS, E.J.G. Brit. J. exp. Path. 41, 513-535 (1960)
12. GLADSTONE, G.P.: Staphylococcal haemolysins
Postepy Mikrobiologii t. v.
2, 145-161 (1966)
13. HALLANDER, H.O.: Extracellular factors of Staphylococcus aureus with special reference to enterotoxin and delta-lysin
Acta Universitatis Upsaliensis
45 (1968)
14. HENTSCHEL, G.: Untersuchung über Staphylokokken-Fibrinolysin
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 26,
195-201 (1968)
15. JACKSON, A.W.: The delta-toxin of Micrococcus pyogenes var. aureus
Bact. Proc. 9, 88 (1956)
16. JEFFRIES, C.D.: Rapid method for determinating the activity of microorganisms on nucleic acids
FRANK, D.H.
GUSE, D.G.
J. Bact. 73, 590-591 (1957)
17. JENSEN, T.: A study of the action of staphylococcus toxin on leucocytes
MAALØE, O.
Acta Path. Microbiol. Scand.
27, 315-324 (1950)
18. JOHANOWSKY, J.: The significance of staphylococcal α -toxin and leucocidin
Folia biol. (Praha) 3, 10-16 (1957)
19. JOHANOWSKY, J.: Die Bedeutung des Antileukozydins und Antitoxins bei der Immunität gegen Staphylokokken-Infektionen
Z. Imm. Exp. Therap. 116, 318 (1958)

20. JULIANELLE, L.A.: Studies of haemolytic staphylococci
J. Infect. Dis. 31, 256-284 (1922)
21. KANOE, M.: Selektive Anreicherung von Staphy-
LOBEL, H. lokokken-Panton-Valentine-Leukozidin
SCHAEG, W. mit Aluminiumoxid-Cholesterin
Z. Naturforschg. 24 b, 1431-1435
(1969)
22. KORBECKI, M.: Action of staphylococcal toxins in
JELASZEWICZ, J. cell cultures
J. Infect. Dis. 115, 205-213 (1965)
23. KWARECKI, K.: Injury of the rat peritoneal mast
SZMIGIELSKI, S. cells in vivo by staphylococcal
JELJASZEWICZ, J. alpha-haemolysin and leucocidin
ZAK, C. J. Infect. Dis. 118, 360-364 (1968)
24. LACK, C.H.: Serological tests for staphylococcal
TOWERS, A.G. infection
Brit. med. J. 10, 1727 (1962)
25. VON LINGELSHEIM, W.: Ätiologie und Therapie der Sta-
phylokokkeninfektionen
In "E.V.Behring: Beiträge zur ex-
perimentellen Therapie"
Urban und Schwarzenberg,
Berlin und Wien (1900)
26. LOWRY, O.H.: Protein measurement with the Folin
ROSEBROUGH, N.J. phenol reagent
FARR, A.L. J. biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
RANDALL, R.J.
27. MEYER, W.: Über die Brauchbarkeit des Koagulase-
testes mit verschiedenen Plasmaarten
zur Differenzierung von Staphylo-
coccus-aureus-Stämmen
Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.
209, 465-481 (1966)

28. MEYER, W.: Über die Brauchbarkeit des Kristall-violett-Testes zur Differenzierung von Staphylococcus-aureus-Stämmen
Z. Hyg. Inf.-Krh. 153, 158-163 (1967)
29. NEISSER, M.: Über das Staphylotoxin
WECHSBERG, F. Z. Hyg. Inf.-Krh. 56, 299-349 (1901)
30. OAKLY, J. L.: The toxins of Clostridium
WARRAK, G. H. oedematiens (Cl. novyi)
CLARKE, P. H. J. gen. Microbiol. I, 91-107 (1947)
31. OGURTSON, R. P.: The effect of staphylococcal toxins
on blood cells and tissue cultures
Bjul. Exsp. Biol. Med. 64, 34-35 (1967)
32. PANTON, P. N.: Staphylococcal toxin
VALENTINE, F. C. O. Lancet 222, 506-508 (1932)
33. ROBINSON, J. J.: The technic and significance of anti-
streptolysin O and antistreptolysin
S determinations
Naval Medical Research Unit No. 4
(1950)
34. SKEGG, J. L.: International reference preparation
ANDERSON, S. G. of antistaphylococcal P-V-Leucocidin
serum
Bull. Wld. Hlth. Org. 40, 593-600
(1969)
35. SMITH, R. F.: Rapid plate method for screening
WILLETT, N. P. hyaluronidase and chondroitin
sulfatase-producing microorganisms
Appl. Microbiol. 16, 1434-1436 (1968)
36. STEIN, Ph.: Tierexperimentelle Untersuchungen
über die Bedeutung des Staphylokokken-
Anti- α -Hämolysins und des Anti-P-V-
Leukozidins für den Schutz vor
Staphylokokkeninfektionen
Behringwerk-Mitteilungen 61, 61-78
(1966)

37. SZMIGIELSKI, S.: Function of the leucocytic system
JELJASZEWICZ, J. in the rabbit in the course of
WILCZYŃSKI, J. experimental staphylococcal infection
Exp. Med. Microbiol. Vol. XVII, No. 3,
214-224 (1965)
38. VALENTINE, F.C.O.: Further observations on the role
of the toxin in the staphylococcal
infection
Lancet 230, 526-531 (1936)
39. VAN DE VELDE, H.: Etude sur le mécanisme de la
virulence de staphylocoque pyogène
Cellule 10, 401-410 (1894)
40. VIDAL, G.: Vaccination avec la leucocidine dans
la mammite staphylococcique de la
brébis
Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.
8 (2), 291-299 (1968)
41. WENK, K.: Leukozyde Substanzen von Staphylo-
kokken
Dissertation, Giessen (1969)
42. WOODIN, A.M.: Fractionation of a leucocidin from
Staphylococcus aureus
Biochem.J. 73, 225-237 (1959)
43. WOODIN, A.M.: Purification of the two components
of leucocidin from Staphylococcus
aureus
Biochem.j. 75, 158-165 (1960)
44. WOODIN, A.M.: The effect of staphylococcal
leucocidin on the leucocyte
Biochem.J. 80, 562-572 (1961)

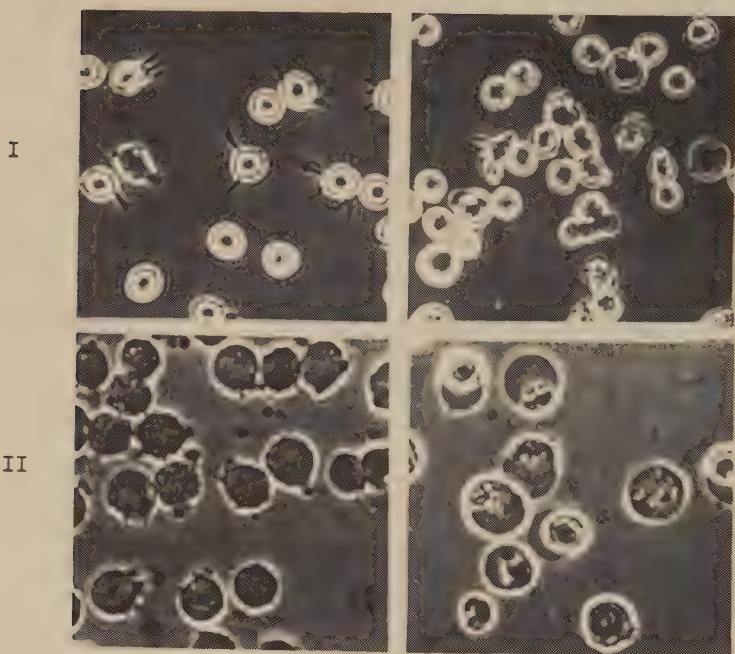
45. WOODIN, A.M. Staphylococcal leucocidin
Ann. N.Y. Acad.Sci. 128 (1),
152-164 (1965)
46. WOODIN, A.M.: Staphylococcal leucocidin
Postepy Mikrobiologii t.v.,
2, 163-169 (1966)
47. WOODIN, A.M.: The basis of leukocidin action
The biol. Basis of Med.
London: Academic Press (1969)
48. WRIGHT, J.: Staphylococcal leucocidin and
anti-leucocidin
Lancet 230, 1002-1004 (1936)

Abb. 11

Leukozyten vor (I) und nach (II) der Einwirkung
von PVL

Menschenleukozyten

Rinderleukozyten



Die Fotografien der Abb. 11 sind phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen bei 320-facher Vergrößerung (Objektiv: Neofluar⁽¹⁾ 40/0,75, Belichtungszeit 1/60 Sek.)

(1) Carl Zeiss, Oberkochen, Württ.

Herrn Prof. Dr. H. Blobel möchte ich für die Themastellung und die jederzeit gewährte Unterstützung, sowie Herrn Dr. K. Wenk für zahlreiche fruchtbare Diskussionen recht herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Dengler, Medizinische Kliniken und Polikliniken der Justus Liebig-Universität Gießen und Herrn Prof. Dr. Tillmann, Geburtshilfliche Veterinärklinik der Justus Liebig - Universität Gießen, danke ich dafür, daß sie es mir ermöglicht haben, Blut zur Leukozytengewinnung von ihren Patienten zu erhalten.

Lebenslauf

- 1944 13. September geboren in Riedelbach/
Krs. Usingen
- 1951 - 1955 Volksschule in Haintchen / Krs. Limburg
- 1955 - 1957 Aufbauzug der Mittelschule in Usingen
- 1957 - 1964 Aufbaugymnasium in Usingen
- 1964 24. Februar Reifeprüfung
- 1964 - 1970 Studium der Veterinärmedizin an der
Justus Liebig-Universität Gießen
- 1968 Veterinärpraktikantenzeit bei Herrn
Dr. Haas in Laubus-Eschbach/Oberlahn-
kreis
- 1970 15. Februar Tierärztliche Prüfung
und Approbation
- 1970 - 1971 Anfertigung dieser Dissertation am
Institut für Bakteriologie und Immuno-
logie der Justus Liebig-Universität
Gießen unter Anleitung von Professor
Dr. H. Blobel
- seit 1970 Als wissenschaftliche Hilfskraft am
Institut für Bakteriologie und Immunolo-
gie der Justus Liebig-Universität
angestellt.

